Versuche zur Lokalisierung des Virus der Gänsehepatitis in infizierten Gänseembryonen und Gänseküken mittels der Immunofluoreszenz

Gabriele Winteroll

1973

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Irmgard Gylstorff

Versuche zur Lokalisierung des Virus der Gänsehepatitis in infizierten Gänseembryonen und Gänseküken mittels der Immunofluoreszenz

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Gabriele Winteroll
aus Pfullendorf

München 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. I. Gylstorff
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 27. Juli 1973

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTÜBERSICHT

Seite

I. Einleitung 1

II. Literatur 2

III. Bedeutung der Immunofluoreszenz für die vorliegende Fragestellung 8

IV. Eigene Untersuchungen 9

1. Versuchsanstellung 9

2. Material und Methoden 10

a) Experimentelle Infektion embryonierter Gänseeier 11

b) Experimentelle Infektion von Gänseküken 12

c) Gewinnung von Hyperimmunserum 13

d) Vorbehandlung des Serums

e) Virusnachweis mittels der direkten Immunofluoreszenzmethode 17

f) Virusnachweis mittels Gewebekulturen 21
1. Makromethode als Vorversuch
2. Mikromethode

3. Ergebnisse

a) Erscheinungsformen der Fluoreszenz bei vorliegenden Untersuchungen 27

b) Veränderungen in Gewebekulturen 27

c) Ergebnisse der bei Embryonen durchgeführten Untersuchungen 28

d) Untersuchungsergebnisse bei Gänseküken 34

V. Diskussion 43

VI. Zusammenfassung 48

VII. Literaturverzeichnis 50

VIII. Abbildungen 54

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554604_0053

I. EINLEITUNG:

Verlustreiche Seuchen bei Junggänsen werden unter den verschiedensten Bezeichnungen wie "exsudative Septikämie" (MC.FADYEAN,1902) oder "Gänseinfluenza" von CSATARI und NYIREDY (1966), TEMESI (1966), CSONTOS und CSATARI (1967) sowie von MANDELLI und RINALDI et al. (1970) beschrieben. Spätere Autoren wählen Bezeichnungen wie "Gänsepest" (VAN CLEEF und MILTENBURG,1966; KRAUSS,1965), "Virusenteritis" (KONTRIMAVICHUS et al.,1967), "Hépato-néphrite-ascite d'oison" (COUDERT et al.,1972 und GAUDRY et al.,1970), "New Disease of goslings" (CRIGHTON und WILKINSON,1970). Derzeit können aufgrund eingehender Identifizierung verschiedener Virusisolate einzelne Krankheitsbilder voneinander abgegrenzt werden.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden mit dem von SCHETTLER (1971) isolierten Virus der Gänsehepatitis durchgeführt. Mit Hilfe der Immunofluoreszenz (IF) soll die Frage geklärt werden, in welchen Organen das Antigen haftet und inwieweit zwischen dem Vorhandensein von Virusantigen, und patho-morphologischen Veränderungen von Organen Zusammenhänge bestehen. Die durch Immunofluoreszenz erhaltenen Ergebnisse werden durch dazu parallel durchgeführte quantitative Virusbestimmungen in diesen Organen ergänzt.

II. LITERATUR:

Das von SCHETTLER (1971 c,d) den Parvoviren zugeordnete Gänsehepatitisvirus (GHV) verursacht eine bei Gänseküken bis zu einem Alter von 28 Tagen auftretende, verlustreiche Erkrankung. Sie ist wirtspezifisch für bestimmte Anatidae wie z. Bsp. für Gänse, Canadagänse (Branta canadensis canadensis), Schneegänse (Chen hyperborea atlantica) und Moschusenten (Cairina moschata). Unempfänglich gegen das Virus waren Hühnerküken, Putenküken und weiße Pekingentenküken (SCHETTLER, 1971 a,c,d; 1972). Die Manifestation der Krankheit ist abhängig vom Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion sowie vom Vorhandensein maternaler Antikörper (SCHETTLER, 1972).

Die Inkubationszeit, die bei SCHETTLER mit 5 - 12 Tagen angegeben ist, wird auch bei anderen Gänseviruserkrankungen unterschiedlicher Ätiologie beobachtet. Die Mortalität schwankt in Abhängigkeit vom Vorhandensein maternaler Antikörper (AK) zwischen 20 und 100 %. Sie ist am Ende der Brutperiode erhöht,was SCHETTLER (1971 b) mit dem Abbau der maternalen AK und der Virusanreicherung in der Umwelt in Zusammenhang bringt.

Die Übertragung erfolgt horizontal durch direkten oder indirekten Kontakt von Tier zu Tier. Der Mensch kommt ebenfalls als mechanischer Virusüberträger infrage (SCHETTLER 1971 d). SCHETTLER konnte 1972 die vertikale Übertragung durch Isolierung des GHV aus nichtinokulierten Gänseembryofibroblastenkulturen nachweisen, die aus natürlich infizierten Bruteiern gewonnen wurden.

Epidemiologisch wichtig ist demnach die inapparent infizierte Zuchtherde. Auch Moschusenten spielen als Überträger eine wichtige Rolle. Das klinische Krankheitsbild und die Sektionsbefunde sind bei den verschiedenen seuchenhaften Viruskrankheiten der Junggänse häufig so uniform, daß eine ätiologische Diagnose nur durch Virusisolation und Differenzierung möglich ist.

Das klinische Erscheinungsbild
der Gänsehepatitis unterteilt SCHETTLER (1971 a,e) aufgrund von Beobachtungen an experimentell infizierten Gänseküken in 3 Erscheinungsformen:

I. Die Infektion von 1 - 8 Tage alten Gösseln führt zu einem akuten bis perakuten Krankheitsverlauf, dem alle Gössel zum Opfer fallen, wenn sie nicht durch maternale AK geschützt sind. Als erste Anzeichen zeigen die Tiere Anorexie und Polydypsie. Schon nach wenigen Tagen wird auch die Wasseraufnahme reduziert. Die Gänschen sind vermehrt wärmebedürftig und drängen zusammen. Manche zeigen ruckartige Kopfbewegungen. Teilweise tritt Lidbindehautentzündung auf. Ein eingefallenes Gesicht und verklebte Augen charakterisieren die kranken Tiere. Vor Schwäche können sie sich kaum mehr erheben und sterben nach wenigen Stunden.

II.a) Verläuft bei im Alter von 12 - 14 Tagen infizierten Gänschen die Seuche akut, so zeigen sich folgende Krankheitserscheinungen: Bei reduzierter bis fehlender Futteraufnahme und geringem Wasserverbrauch läßt sich ein dünnflüssig weißlicher, später schleimig weißer Kot beobachten. Die Tiere sind auffallend müde und schwach. Vielfach liegen Verklebungen der Nasenöffnungen und der Augen vor. An Zunge und Gaumen fallen membranartige, fibrinöse Auflagerungen auf. Der Tod tritt hier 4 - 10 Tage nach Erscheinen der ersten Symptome ein.

II.b) Beim protrahierten Verlauf in dieser Altersstufe kommt es zu einer erheblichen Wachstumsdepression und zu Federausfall, der besonders am Hals, an den Flügeln und auf dem Rücken sichtbar wird. Als pathognomonisch ist bei den nackten Gösseln die stark gerötete Haut und die geschwollene Bürzeldrüse anzusehen. Die Tiere sind schwach; sie sondern sich von der Herde ab und verenden in der 8. - 10. Woche p.i.

III. Schließlich liegen Beobachtungen von im Alter von 3 Wochen infizierten Gänschen vor. Sie erkranken klinisch nur teilweise, mit protrahiertem Krankheitsverlauf (ähnlich II.b). Es werden hier zusätzlich vermehrt Lahmheiten beobachtet. Ein Teil der so infizierten Tiere stirbt, andere überleben, bleiben aber Kümmerer. 30 % davon weisen in der 10. - 12. Woche eine Lidbindehautentzündung auf. Bei den überlebenden Gänsen wachsen neue Federn, deren Kiele jedoch leicht brechen. Anschließend können nicht selten bakterielle Sekundärinfektionen der Pulpa gesehen werden.

4 Wochen und ältere Junggänse durchseuchen inapparent. Alle im Experiment beobachteten Charakteristika werden auch bei Seuchenausbrüchen durch Feldinfektionen gesehen (SCHETTLER,1971 b,c).

Pathologie:

Feldinfektionen mit GHV führen bei den betroffenen Gänseküken (GK) zu folgenden von SCHETTLER (1971 b,c,e,1972) beschriebenen pathologischen Veränderungen. Charakteristisch ist eine Vergrößerung der Leber, des am häufigsten betroffenen Organes. Sie ist von weich elastischer Konsistenz, dunkelbraun gefärbt und weist petechiale Hämorrhagien auf. Außerdem besteht eine deutliche Abrundung der sonst scharfen Leberränder. Ihre grau-braune Schnittfläche wird als feucht, aber ohne besondere Blutfülle beschrieben. In anderen Fällen ist die Konsistenz der Leber derb. Bei allen Tieren beobachtet SCHETTLER eine hochgradige Gallestauung und stecknadelkopfgroße, graugelbe Herde im Pankreas. Die Luftsäcke sind häufig derb und mit fibrinösen Pseudomembranen überzogen. Bei vielen Tieren können

Perikarditis und Perihepatitis mit fibrinösem Exsudat auf der Leberoberfläche diagnostiziert werden. Die Bürzeldrüse ist nach SCHETTLER um das 5 - 10 fache vergrößert, mit grau bis roter Schnittfläche. In der Drüse war 0,3-0,5ml einer graugelben zähen Flüssigkeit vorhanden.
Keine makroskopischen Veränderungen können an Milz, Niere und Darm festgestellt werden.

Nach experimenteller Infektion von Gänseküken gelang es SCHETTLER (1971 a,c) die gleichen Alterationen in verschiedenen Stadien zu beobachten. Verschiedene Grade an Herzdilatation wurden als Folge einer Kompensation bzw. Dekompensation der leberbedingten Kreislaufstörungen angesehen. Auch Aszites trat in variierendem Ausmaß auf (SCHETTLER ,1971 e).

Infolge von Virusinokulation abgestorbene Gänseembryonen sind durch stark gerötete Haut, subkutanes Ödem und durch unregelmäßige graugelbe Nekroseherde in der Leber gekennzeichnet (SCHETTLER, 1971 b, c, d, e).

Als histopathologische Alterationen
beschreibt SCHETTLER (1971 e) bei Gänschen, die in der akuten Phase gestorben sind eine hochgradige, nicht fettige vakuoläre Degeneration der Hepatozyten. Um Leberkapillaren werden herdförmige, koagulisierende Nekrosen mit Invasion von Heterophilen sichtbar. In den Kernen mancher alterierter Leberzellen, nahe den Leberkapillaren und den Kupferschen Sternzellen konnten intranukleäre Einschlußkörperchen identifiziert werden. Weder im Herzmuskel, noch in der Skelettmuskulatur waren Veränderungen nachzuweisen.

Die Symptomatik, die primär durch die Virusinfektion bestimmt ist, wird im Feld durch sekundäre Begleitinfektionen kompliziert und verwischt. Eine besondere Rolle spielen dabei Infektionen mit Salmonella typhi-murium und, oder Aspergillus. Außerdem konnten bei verendeten Gänschen auch Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa und gelegentlich hämolysierende Streptokokken isoliert werden (SCHETTLER,1971 e). Es besteht jedoch kein Hinweis, daß unter Versuchsbedingungen andere Mikroorganismen als das Virus die Krankheit auslösen.

Viruseigenschaften:

Das die Gänsehepatitis verursachende Virus konnte von SCHETTLER (1971 c,1972) als ein sehr kleines DNS-Virus mit einer Partikelgröße von weniger als 50 nm identifiziert werden. Das Virus ist sehr widerstandsfähig gegenüber physikalischen und chemischen Inaktivierungsmitteln. Es zeichnet sich durch Resistenz gegen Fettlösungsmittel und durch hohe Stabilität gegen sauren pH (pH=3) aus. Außerdem blieb die Infektiosität auch nach dreistündiger Einwirkung von 56° C Wärme erhalten.
Das Virus läßt sich in 14 Tage alten embryonierten Gänseeiern und Moschusenteneiern gut passieren. SCHETTLER (1971 b,c) inokulierte dazu Gewebesuspensionen von Leber und Pankreas infizierter Gössel. Die Embryonen starben mit ziemlicher Regelmässigkeit nach einer weiteren Bebrütung am 5. - 6. Tag p.i. ab.
Noch empfindlicher ist der Nachweis in der Gänseembryofibroblastenkultur. Der hier verursachte zytopathische Effekt (CPE) ist charakterisiert durch Schrumpfung und Lysis der Zellen, die sich dann vom geschlossenen Zellrasen ablösen (SCHETTLER,1971 c,1972). In MAY-Grünwald gefärbten Zellkulturen konnte SCHETTLER eosinophile intranukleäre Kerneinschlußkörper sowie im Gegensatz zur Histopathologie auch zytoplasmatische Einschlusse nachweisen.

Durch Verimpfung fortlaufender Passagen an Gössel konnte die Krankheit unter Auftreten der für sie charakteristischen Leberveränderungen im Experiment immer wieder reproduziert werden (SCHETTLER, 1971 c). Als Infektionsmaterial verwendet SCHETTLER vielfach Allantoisflüssigkeit und embryonales Gewebe.

Die Kontagiosität des Virus wird durch folgenden von SCHETTLER durchgeführten Versuch deutlich: Bei gemeinsamer Haltung von infizierten Tieren mit Kontaktkontrollen entwickeln diese eine akute Gänsehepatitis.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen vermutet SCHETTLER (1971 c,d), daß das von ihm isolierte Virus, bedingt durch seine Größe, seine biochemischen Eigenschaften, durch seinen Nukleinsäuretyp, ebenso wie sein Verhalten in Gewebekulturen, der Parvovirusgruppe zuzuordnen ist.

Serologie:

Das SCHETTLER' sche Isolat zeigt keine antigene Verwandtschaft zu anderen Geflügelviren. Dies wurde aufgrund von Neutralisationstests unter Verwendung von Antiseren gegen Aviäre Encephalomyelitis, Entenpest, Entenhepatitis und Isolat Krauss (1965) als Reaktionskomponenten ermittelt (SCHETTLER, 1971 b). Tauben- Anti-GHV- Immunserum dagegen verhindert komplett die Bildung eines zytopathischen Effektes im Neutralisationstest (SCHETTLER, 1972).

Bei Infektionen mit GHV konnten keine präzipitierenden Antikörper nachgewiesen werden. Der Mikroagargelpräzipitationstest (AGP) unter Verwendung von Chorioallantoismembran und Leber infizierter Embryonen und verdünntem Serum als Reaktionskomponenten verlief negativ. Aus dem AGP-Test läßt sich auch die Feststellung ableiten, daß GHV kein gemeinsames Antigen mit Infektiöser Bronchitis, Newcastle disease, Geflügelpocken, Infektiöser Laryngotracheitis, Reovirus und Influenza A besitzt (SCHETTLER, 1971 b,c).

Komplementbindungsreaktionen zeigten eine streng spezifische Komplementfixation (SCHETTLER,1971 d). Hierzu verwendete SCHETTLER hyperimmunes Anti-GHV-Serum von Tauben als Antikörper (AK) und Allantoisflüssigkeit inokulierter Gänseeier als Antigen (AG).

In Abklatschpräparaten konnte SCHETTLER (1971 d,1972) mit Hilfe der direkten Immunofluoreszenz granuläre Fluoreszenz speziell in den Zellen von Leber und Pankreas beobachten. In der Gewebekultur zeigten die mit spontanem CPE behafteten Zellen starke spezifische Fluoreszenz. Spezifische Antikörper gegen GHV konnten mit fluoreszeinkonjugiertem Kaninchen-Anti-Gänsegammaglobulin nachgewiesen werden.

Bedeutung der Immunofluoreszenz für die vorliegende Fragestellung:

Mit vielen klassischen Methoden der Serologie und der Immunologie können die Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper nur indirekt mit Hilfe von Indikatorsystemen nachgewiesen werden. Meistens kann die Immunologie nur eine Aussage über den Gesamtorganismus machen, während mittels der Immunofluoreszenz eine Aussage über Organe und Zellen möglich ist. Mit der Immunofluoreszenz ist der unmittelbare optische Nachweis und die Lokalisierung der Bindung zwischen Antigen und Antikörper möglich. Es können Viren oder deren Teilantigene in Zellen gesucht und erkannt werden, in denen sie keine pathogene Wirkung entfalten. Diese Gewebe können aber für die Pathogenese, für die Persistenz der Infektion und für die Immunität von Bedeutung sein. Außerdem stellt die Immunofluoreszenz eine echte serologische Schnellmethode für die Diagnose dar. Mittels homologer, konjugierter Antiseren ist die Spezifität von Virusantigenen und der Ort, wo es sich vermehrt, eindeutig bestimmbar. Die hohe Empfindlichkeit der Methode beruht darauf, daß die verwendeten Fluorochrome nicht Licht absorbieren, sondern Licht emittieren.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Versuchsanstellung:

A: Nachweis von Gänsehepatitisvirus in experimentell infizierten Gänseembryonen. Zur Inokulation werden 12 - 16 Tage lang bebrütete Gänseeier via Chorioallantoismembran (CAM) infiziert.

B: Lokalisierung des GHV in experimentell infizierten Gänseküken (GK), in natürlich infizierten GK und in einem experimentell infizierten Moschusentchen. Dazu werden verschiedene Altersgruppen von GK infiziert und die fluoreszenzserologischen Untersuchungen nach verschiedenen Zeitabständen durchgeführt.

C: Quantitative Virusbestimmungen in den fluoreszierendes Antigen enthaltenden Organen dieser Tiere.

Der Nachweis von Virusantigen erfolgt mittels des "Direkten Immunofluoreszenztestes". Das Untersuchungsmaterial liegt in Form von Abklatschpräparaten von Organen oder als Zellsedimente von Körperflüssigkeiten vor. Zur Fixierung wird Azeton verwendet.
Zur quantitativen Virusbestimmung werden Organsuspensionen auf Gewebekulturen titriert. Der entstehende zytopathische Effekt (CPE) wird durch Fluoreszenzfärbung abgesichert. Unspezifische Fluoreszenz kann durch Anfertigung entsprechender Kontrollpräparate ausgeschlossen werden.

Für die Immunofluoreszenz dienen Hyperimmunseren von Moschusenten und von Emdener - Gänsen, die nach wiederholten Infektionen von GHV gewonnen werden.

Die zur Untersuchung verwendeten embryonierten Gänseeier stammen von Elterntieren, die keine Antikörper (AK) gegen

GHV aufwiesen. Sie wurden konstant aus diesem Wirtschaftsbestand bezogen.

Sämtliche verwendeten Gänseküken sind der Emdener - Rasse zugehörig. Sie wurden aus bestimmten Gänsebeständen bezogen und im Institut für Krankheiten des Haus - und Wildgeflügels in Isolierstallungen untergebracht. Nach Entnahme von Blutproben mittels Herzpunktion wurde der Antikörperstatus der Tiere gegen GHV im Serumneutralisationstest (SN - Test) ermittelt. Vor der experimentellen Infektion wurden die Gössel in Infektionsstallungen umgesetzt und bei pelletiertem Kükenfutter ad libitum gehalten. Bei jeder Versuchsgruppe wurden 2 nichtinfizierte, separat gehaltene Kontrolltiere getestet. Bei den natürlich infizierten Gänseküken handelt es sich um von Gänsebeständen eingesandte, erkrankte oder verendete Tiere, bei denen der klinische Verdacht auf Gänsehepatitis bestand.

Als Infektionsmaterial dient pathogenesGHV (Stamm SHM 319 und Isolat F 4172) einer 4. - 6. Passage über Gänseembryonen und einer 4. Gewebekulturpassage. Dieses wird nach Filtration durch einen Millipore - Membranfilter bei einer Porengröße von 450 nm appliziert.

Herstellung des Embryonenhomogenisates:
Leber, Niere und Milz von mit GHV infizierten Gänseembryonen werden steril entnommen, mittels dem Ultra - Turrax homogenisiert, kurz abzentrifugiert, und der Überstand wird nach Überprüfung auf Bakterienfreiheit für Infektionsversuche verwendet.
Der Titer des Embryonenhomogenisates betrug $10^{4,5}$ ELD_{50}/ml (= 50% embryo-letale Dosis), der Titer der verwendeten Allantoisflüssigkeit (AAF) lag bei $3,3 \times 10^{5}$ ELD_{50} pro ml, und die Virussuspension hatte einen Titer von 10^{5} KID_{50} pro ml (= 50 % kultur-infektiöse Dosis).

Die inokulierten Gänseeier werden bei 37,8°C Wärme und 55 % Luftfeuchtigkeit unter täglichem Wenden und Schieren bis zu ihrem Absterben im Kunstbrüter bebrütet.

Tabelle I:

Experimentelle Infektion embryonierter Gänseeier

Anzahl der infizierten embryonierten Gänseeier	Alter der Embryonen bei der Infektion	Infektions-material	Infektions-modus und Dosis
Gruppe 1: 2 Embryonen	10 Tage lang bebrütet	GHV-SHM 319 Embryonen-homogenisat 450 nm filtr.	auf CAM (ungesenkt) je 0,5 ml
Gruppe 2: 7 Embryonen	11 Tage lang bebrütet	"	"
Gruppe 3: 4 Embryonen	13 Tage lang bebrütet	"	auf CAM (ungesenkt) je 1,0 ml
Gruppe 4: 15 Embryonen	14 Tage lang bebrütet	GHV-SHM 319/ 4.Kulturpass.	auf CAM (ungesenkt) je 1,0 ml (1:50 verd.)
Gruppe 5: 2 Embryonen	16 Tage lang bebrütet	GHV-SHM 319 Embryonen-homogenisat 450 nm filtr.	auf CAM (ungesenkt) je 1,0 ml

Pro 1 ml Ei - Inokulum werden je 3000 IE Penicillin und 15 mg Dihydrostreptomycin zugesetzt.

GHV-SHM 319 = Gänsehepatitisvirus Stamm SHM 319
CAM = Chorioallantoismembran
450 nm filtr. = durch einen Millipore-Membranfilter bei einer Porengröße von 450 nm filtriert.

Titer des Embryonenhomogenisates : $10^{4,5}$ ELD_{50} pro ml (= 50% embryoletale Dosis)

Titer der Virussuspension : 10^{5} KID_{50} pro ml (= 50% kulturinfektiöse Dosis)

Tabelle II:

b) Experimentelle Infektion von Gänseküken (GK) und einem Moschusentchen

Anzahl der infizierten Gänseküken	Alter zur Zeit der Infektion	Infektions-material	Infektions-modus und Dosis
Gruppe 1: 4 GK	2 Tage	AAF/6.Pass. von GHV-SHM 319	intramuskulär je 1,0 ml
Gruppe 2: 8 GK	3 Tage	"	oral je 1,0 ml (mit Pipette)
Gruppe 3A: 8 GK	10 Tage	"	"
Gruppe 3B: 8 GK	10 Tage	GHV Isolat F 4172	"
Gruppe 4: 5 GK	14 Tage	AAF/6.Pass. von GHV-SHM 319	intramuskulär je 1,0 ml
1 GK	3 Tage	GHV Isolat F 4172	über Trinkwasser
1 Entenküken (Cairina moschata)	5 Tage	AAF/6.Pass. von GHV-SHM 319	oral 1,0 ml (mit Pipette)

GHV - SHM 319 = Gänsehepatitisvirus Stamm SHM 319
Titer der Allantoisflüssigkeit = $3{,}3 \times 10^5$ ELD_{50}
(= 50% embryoletale Dosis)
Titer der Virussuspension = 10^5 KID_{50} (= 50% kulturinfektiöse Dosis)
Bakterielle Untersuchungen des Infektionsmaterials verliefen negativ.

d) Gewinnung von Hyperimmunserum

Als Versuchstiere dienen 2 Moschusenten und 4 Emdenergänse.

Zur Immunisierung wird bei a) und b) Gänsehepatitisvirus Stamm SHM 319 (GHV- SHM 319), 4. Embryopassage (Verdünnung 1 :50) verwendet. Die unter c) aufgeführten Emdenergänse werden mit einer 6. Passage über Gänseembryonen (Verdünnung 1: 5) immunisiert. Für die intramuskuläre Injektion (i.m.) und für die subkutane Injektion (s.c.) wird Gänseembryonenhomogenisat verwendet. Intravenös wird Allantoisflüssigkeit (AAF) injiziert. Vor der Applikation wird das Infektionsmaterial bakterienfrei filtriert.

Immunisierungs -Schema:

a) 2 Enten (Cairina moschata)
Flügelmarken 1679
1680

1. Tag	je 2	ml	s.c.
10 "	je 2	ml	s.c.
13. "	je 5	ml	s.c.
19. "	je 3	ml	i.v.
21. "	je 3	ml	i.m.
25. "	je 3	ml	i.m.
39. "	geblutet[1]		
70. "	je 2,5	ml	i.m.
77. "	je 3,5	ml	i.v.
91. "	je 2,5	ml	i.v.
96. "	geblutet		

[1] Am 39. Tag liegt der Antikörpertiter des Entenserums bei 1 : 1600, da es aber fluoreszenznegativ ist, erhalten die Tiere weitere Injektionen.

b) 1 Emdenergans
(16 Jahre alt)

1. Tag	5	ml	i.m.
8. "	2	ml	i.v.
15. "	2	ml	i.v.
23. "	2,5	ml	i.v.
26. "	2,5	ml	i.v.
29. "	2,5	ml	i.v.
36. "	3,5	ml	i.v.
48. "	geblutet		

c) 3 Emdenergänse
(3 Monate alt)

1. Tag	je 5 ml	i.m.
7. "	je 5 ml	i.m.
14. "	je 5 ml	i.m.
21. "	je 5 ml	i.m.
35. "	je 5 ml	i.m.
44. "	je 3 ml	i.v.
55. "	geblutet	

Die so erhaltenen Seren werden dann nach entsprechender Präzipitation der Gammaglobuline als Antikörperkomponente in der Immunofluoreszenztechnik verwendet. Ihre AK - Titer liegen bei:

a) Moschusenten : 1 : 14 600
b) Gans : 1 : 1 024
c) Gänse : 1 : 40 960

Alle angegebenen Titer wurden im Serumneutralisationstest ermittelt. Zur Anwendung gelangte die Serumverdünnungsmethode, wobei die Seren in 2 er Potenzen verdünnt und gegen eine konstante Virusmenge von 100 KID_{50} (= 50 % kulturinfektiöse Dosis) GHV-SHM 319 in Gewebekulturen getestet wurden.

e) Vorbehandlung der Seren

Sie erfolgte in Anlehnung an die bei KONSTANTINOW - SIEBELIST (1968) dargestellte Methode, die auf COONS (1958) zurückzuführen ist. Geringe Abweichungen davon werden durch Einbeziehung von Techniken anderer Autoren erreicht. Die genaue Beschreibung der Serumbereitung liegt am Beispiel der Seren der immunisierten Moschusenten vor, die gemischt verwendet wurden. Mit den in Gänsen hergestellten Hyperimmunseren wird in gleicher Weise verfahren.

Reagentien:

Entenseren 1679 / 1680 AK-Titer 1 : 14 600

0,85 % ige NaCl-Lösung (physiologisch)

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung pH 7,0

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung[1] (PBS) pH 7,4

Lösung A:	NaCl		8,77 g
	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$		1,78 g
	Aqua dest.	ad	1000 ml
Lösung B:	NaCl		8,77 g
	KH_2PO_4		1,36 g
	Aqua dest.	ad	1000 ml

9 Volumen der Lösung A und 1 Volumen der Lösung B ergeben einen pH von 7,4. Dem fertigen Puffer wird Merthiolat (Fa. Fluka AG, Buchs, Schweiz) im Verhältnis 1 : 10 000 zugesetzt (POETSCHKE, mündl. Mitteilung).

Sephadex[2] G 25 oder G 50 fein (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden)

0,5 M $BaCl_2$

Sulfosalizylsäure, Biuretreagenz (Fa. Asid)

Karbonatpuffer 0,5 M; pH 9,0

$NaHCO_3$	1,85 g
Na_2CO_3	0,3 g
Aqua dest.	50 ml

Fluorescein-Isothiocyanat, A-Komponente (FITC) (Fa. Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg)

[1] Der verwendete Phosphatpuffer ist einer Broschüre über Fluoreszenz entnommen, die von der Biologischen Arbeitsgemeinschaft in Lich herausgegeben wurde. Es handelt sich dabei um die Pufferlösung nach COONS.

[2] Sephadex wird vor der Verwendung durch Waschen in PBS equilibriert.

Serumfraktionierung

Die Serumfraktionierung wird mit gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ zu 50 % Endsättigung durchgeführt (nach KONSTANTINOW, 1968), unter Verwendung der angegebenen PBS-Lösung.

11 ml Serum
+ 11 ml physiologische NaCl
+ 22 ml gesättigte $(NH_4)_2SO_4$ Lösung

Nach 2 maliger Fällung wird das Präzipitat mit PBS zum Ausgangsvolumen von 11 ml resuspendiert. Die Entsalzung erfolgt säulenchromatographisch über eine Sephadexsäule. Die so erhaltene Proteinlösung hat 120 % des Ausgangsvolumens, das sind 13,2 ml. Als Elutionsmittel wird PBS verwendet. Beim Austritt aus der Säule wird durch Einleiten in Sulfosalizylsäure das Erscheinen des Proteins durch Bildung eines Niederschlags angezeigt (POETSCHKE, mündl. Mitteilung). 0,5 M $BaCl_2$-Lösung wird bei Zusatz von verdünnter Salzsäure als Indikator für Sulfationen verwendet. Bei Vorhandensein von Sulfat bildet sich sofort ein unlösliches, weißes Präzipitat ($BaSO_4$). In der sulfatfreien Lösung wird mit Hilfe der Biuretmethode photometrisch der Eiweißgehalt ermittelt. Dieser liegt bei den verwendeten Entenseren bei 1,1 g %. (Bei den Gänseseren zwischen 1,5 und 1,6 g %). Durch Verdünnung mit PBS wird eine 1 % ige Proteinlösung hergestellt. Ein Teil dieses Präzipitates wird bei -20° C eingefroren und im "Blocktest" verwendet.

Konjugation des Serums

Für die Konjugation wird die restliche Proteinlösung durch Zusatz von 0,5 M Karbonatpuffer auf einen pH von 9,0 gebracht. (Bei den Gänseseren wird der Karbonatpuffer bereits zum Einstellen auf 1 g % Protein verwendet.) Auf

die Oberfläche der Globulinlösung werden jetzt 5 mg FITC pro 100 mg Protein in Pulverform aufgestreut (WAGNER,1967). Die Konjugation erfolgt während einer Zeit von 18 Stunden bei 4^{o} C auf dem Magnetrührer.

Nicht gebundener Farbstoff wird zunächst durch Zentrifugieren abgetrennt. Die restlichen überschüssigen Kopplungskomponenten des markierten Proteins werden durch Gel-Filtration über Sephadex G 50 eliminiert. Die Säulenchromatographie wird gemäß der Darstellung von JENTZSCH (1967) durchgeführt. Das fertige Konjugat wird in Mengen von 2 ml bei -20^{o} C eingefroren. Kurz vor dem Gebrauch werden zur Ausschaltung unspezifischer Fluoreszenz entsprechende Mengen an Homogenisat nichtinfizierter Gänseembryonen absorbiert (WAGNER,1967). Bei Aufbewahrung absorbierter Konjugate werden diese durch Zusatz von Merthiolat im Verhältnis 1 : 10 000 vor Kontamination geschützt (POETSCHKE,1961).

Der Färbetiter der Konjugate wird mit GHV infizierten Gänsefibroblastenkulturen austitriert (KAWAMURA,1969). Dazu werden entweder bewachsene Deckgläser oder direkt in Plastikpetrischalen gewachsene,Methanol fixierte Kulturen verwendet. Die so ermittelte Arbeitsverdünnung beträgt bei den Seren der Moschusenten 1:7. Sie wird immer erst kurz vor Verwendung der Konjugate durch Verdünnung mit PBS hergestellt.

Virusnachweis mittels der direkten Immunofluoreszenzmethode

Der "Direkte Immunofluoreszenztest" ist ebenfalls nach der Beschreibung von KONSTANTINOW (1968) durchgeführt. Die dargestellte Technik stimmt mit den bei anderen Autoren beschriebenen weitgehend überein und basiert auf der Methodik von COONS (1958).

Das verwendete Organmaterial stammt von den in den Tabellen I und II angeführten Tieren. Die Embryonen wurden nach dem Absterben, die Gänseküken der Gruppen 1 bis einschließlich 3B nach Tötung in Abständen von 24 Stunden fluoreszenzserologisch untersucht. Das gleiche gilt für das Moschusentenküken. Die Gössel der Gruppe 4 wurden, wie auch die natürlich infizierten Tiere nach spontanem Verenden getestet. Von den vorliegenden Organen werden Abklatschpräparate gefertigt (WAGNER,1967). Von CAM und Gehirn werden Quetschpräparate fluoreszenzserologisch untersucht; Allantoisflüssigkeit und Aszitesflüssigkeit werden in Form von Ausstrichen ihrer Sedimente auf fluoreszierendes Antigen (FA) geprüft. Durch Begrenzung der gefertigten Präparate mit einem Spezialstift (Marktex-Tech-Pen,USA) wird das Abfließen der Konjugate verhindert.

Karbonatpuffer pH 8,8[1]

Lösung A:	Na_2CO_3 (wasserfrei)		5,3 g
	NaCl-Lösung 8,5 %	ad	100 ml
Lösung B:	$NaHCO_3$ (wasserfrei)		4,2 g
	NaCl-Lösung 8,5 %	ad	100 ml

Zu 10 ml der Lösung B wird soviel von der Lösung A gegeben, daß der pH 8,8 beträgt.

Einschlussmedium pH ca. 8,8

Glycerin (reinst)	9 Vol.
Karbonatpuffer pH 8,8	1 Vol.

Als feuchte Kammer dient ein verschließbares System, welches nach Zugabe von Wasser bei 37° C untergebracht wird. Die gefertigten Präparate liegen während des Färbevorganges auf einer Styroporplatte, die auf dem Wasser schwimmt.

[1] Karbonatpuffer und Einschlussmedium sind einer Broschüre der Biologischen Arbeitsgemeinschaft in Lich über Fluoreszenz entnommen.

1. Durchführung der Methode

Die Präparate werden gut luftgetrocknet. Besonders bewährt hat sich die Trocknung bei 4° C über Nacht. Danach wird 20 Minuten bei -20° C in Azeton fixiert und erneut luftgetrocknet. Jetzt werden die Präparate mit Konjugat überschichtet und in der feuchten Kammer bei 37° C inkubiert. Nach Abspülen des Konjugates mit PBS werden die Präparate in Färbeküvetten 1 mal 5 Minuten lang in PBS und weitere 5 Minuten in Karbonatpuffer pH 8,8 gewaschen (WAGNER,1967). Durch den zweiten Waschvorgang und das angegebene Einschlussmedium wird über Änderung der Wasserstoffionenkonzentration eine Verstärkung der Fluoreszenz erzielt. Die Beurteilung der Fluoreszenz erfolgt mit Hilfe eines Punktsystems. Maximale Fluoreszenz wird durch ++++, schwache Fluoreszenz dagegen durch + ausgedrückt (WAGNER,1967). Je früher die gefärbten Präparate unter dem Mikroskop betrachtet werden, umso besser sind sie auszuwerten, da die Fluoreszenz schon nach relativ kurzer Aufbewahrungszeit stark an Intensität nachläßt.

Optisches System zur Auswertung der Präparate

Leitz-Ortholux Mikroskop mit original Leitz-Flucreszenzausrüstung, bei Dunkelfeld und Durchlicht

Okular 10 X, Objektiv 54

Erregerfilter BG 12 und BG 38

Sperrfilter 510

Quecksilberdampfdrucklampe HBO 200 (Fa. Osram)

Außerdem wird fluoreszenzfreies Immersionsöl nD -1,515 verwendet.

Die beiliegenden Photographien sind mit einer vollautomatischen Mikroskopkamera Orthomat (Fa. Leitz) aufgenommen. Bei dem verwendeten Farbfilm handelt es sich um einen Ektachrom Highspeed ASA 125/DIN 22 (Fa. Kodak). Die Schwarzweißaufnahmen sind mit einem HP_4-Film ASA 400-650/ DIN 27-29 (Fa. Ilford) aufgenommen.

Nach Ermittlung im direkten IF-Test virushaltige Organe der Gänseküken aus den Gruppen 1, 2, 3 A und 3 B werden durch Titration in der Gewebekultur auf ihren Gehalt an infektiösem Virus geprüft.

2.Kontrollen

Kontrollen sind nach Angaben bei KAWAMURA (1969), POETSCHKE (1961), JENTZSCH (1967), WAGNER (1967) und NAIRN (1964) angefertigt.
Als negative Kontrollen werden Präparate, die sicher frei von GHV-Antigen sind, mit FITC-Konjugat gefärbt. Außerdem werden "Blockteste" durchgeführt. Dazu werden GHV haltige Präparate zuerst mit nichtkonjugierter, homologe Antikörper enthaltender Proteinlösung überschichtet und eine halbe Stunde bei 37° C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Abspülen mit PBS wird der angegebene Färbevorgang mit homologem Konjugat durchgeführt. Die Präparate sind fluoreszenznegativ, da das AG an nicht FITC gekoppelte AK gebunden ist. Die Prüfung auf Autofluoreszenz erfolgt durch alleinige Abdeckung fixierter Präparate mit Einschlussmedium.
Für positive Kontrollen werden Deckgläser, die mit GHV infizierten Monolayerkulturen von Gänseembryfibroblasten (GEF) bewachsen sind, fixiert und mit homologem Konjugat beschickt.

3.Vorversuche zur Immunofluoreszenz

Durch Verwendung der zeitsparenden Methode nach PURCHASE (1970) zur Präzipitation von Serum mit Na_2SO_4 konnten keine verwertbaren Konjugate gewonnen werden.

Bei paralleler Anfertigung von Abklatschpräparaten und Kryostatschnitten (4 u) derselben Organe hat sich gezeigt, daß Abklatschpräparate brillante Fluoreszenzbilder liefern, während bei Kryostatschnitten eher unspezifische Fluoreszenz von Seiten des Gewebes auftritt, was sich störend auf die Auswertung der Präparate auswirkt.

Weiterhin wurden verschiedene Fixierungen getestet, wobei sich Azeton für Deckglaskulturen und Methanol für Kulturen in Plastikpetrischalen als optimale Fixierungsmittel erwiesen. In unfixierten Präparaten ist kein fluoreszierendes Virusantigen nachweisbar.

f)Virusnachweis mittels Gewebekultur

1.Makromethode als Vorversuch

Durch Titration von Organmaterial in Plastikpetrischalen wird der jeweilige Gehalt an infektiösem Virus in den Organproben getestet. Die in der Gewebekultur gesehenen Veränderungen werden anfänglich durch Direktnachweis von fluoreszierendem Virusantigen abgesichert (nach der Methode von THIEL und SMITH,1967). Die Vorteile dieser Technik sind, daß hier in einer Schale, von unter völlig gleichen Bedingungen gehaltenen Zellen, gleichzeitig Proben und Kontrollen ("Flocktests") angelegt werden können.

Technisches Material

Plastikpetrischalen aus Kunststoff, oberflächenbehandelt, zum Einmalgebrauch in der Gewebekultur. Größe 60 x 15 (Fa. C.A. Greiner & Söhne, Nürtingen).

Medium 199, F 10 (siehe Mikromethode)

Das Organmaterial
wird in vorliegenden Suspensionen verwendet (siehe Mikromethode).

Zellmaterial

Als Zellen dienen primäre Gänseembryofibroblastenkulturen (GEF), die unter Verwendung von 16 Tage alten Embryonen gewonnen werden. Die Herstellung der Zellkulturen erfolgt durch Kurzzeittrypsination bei Zimmertemperatur auf dem Magnetrührer, nach den im Viruslaboratorium üblichen Methoden. Die infizierten Zellen werden bei den in der Mikromethode angegebenen Bedingungen kultiviert. Außerdem werden auch primäre Moschusentenfibroblastenkulturen verwendet.

Durchführung

Einige Organe experimentell infizierter GK werden als Stichproben in der Makromethode getestet. Dazu werden von den vorbereiteten Organsuspensionen Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-8}, unter Verwendung von 4,5 ml Medium und 0,5 ml Organsuspension als Ausgangsmaterial sorgfältig gemischt. Danach werden diese Verdünnungen in Plastikpetrischalen gegeben und primäre Gänseembryofibroblasten zugesetzt, bis eine Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml erreicht ist. Als Viruskontrollen werden Zellen mit GHV, 43. Passage, in Gewebekulturen inokuliert. Als Zellkontrollen werden nichtinfizierte Zellen kultiviert.

Nach 3 Tagen wird 1 ml Medium zugesetzt, und nach 5 - 6 Tagen erfolgt der 1. Mediumwechsel, nach Dekantieren des alten Mediums. Danach wird das Medium alle 3 - 4 Tage gewechselt.

Beim Auftreten eines CPE wird das Antigen direkt in entsprechenden Kulturen mittels Fluoreszenz nachgewiesen: Das Medium wird abgegossen, der Zellrasen kurz mit PBS abgespült und bei -20° C 15 Minuten mit Methanol fixiert. Mit einem Spezialstift (Marktex-Tech-Pen,USA) wird die Bodenfläche der Schale in kleine Felder unterteilt. Diese werden mit 1 - 2 Tropfen Konjugat bedeckt und bei beschriebenen Bedingungen gefärbt.

Zur Auswertung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop werden diese mit Einschlussmedium versehen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Völlig abgelöste Zellrasen, die frei im Medium schwimmen, werden in PBS gewaschen, auf einen Objektträger aufgezogen, wenn erforderlich gequetscht, Azeton fixiert, FITC gefärbt und ausgewertet.

Außerdem werden Fluoreszenzbilder von direkt in Plastikpetrischalen gefärbten Kulturen mit solchen von infizierten Zellkulturen, die auf Deckgläsern gewachsen sind, verglichen. Dabei zeigt sich, daß die verwendete Technik übereinstimmend mit den Aussagen von THIEL und SMITH (1967) keinen bemerkenswerten Verlust an Lichtemission oder Farbechtheit bringt.

2.Mikromethode

Reagentien

Glasröhrchen von 1 ml Inhalt, Pasteurpipetten, 5 ml Pipetten.

Oberflächenbehandelte Mikroplatten aus Polystryol und PVC zum Einmalgebrauch in der Gewebekultur. Größe 8 x 12 = 96 iger System, U-Form. (Fa. C.A. Greiner & Söhne)

Medium 199, F 10[1]

Earle's A:	NaCl	68,0 g
	KCl	4,0 g
	$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	1,65 g
	$NaHCO_3$	
	Glukose	
	Bidest	1000 ml
Earle's B:	CaCl	4,0 g
	$MgSO_4 \times 7H_2O$	4,08 g
	Bidest	1000 ml

In 500 ml Medium sind enthalten:

0,62 g LAH (TC Lactalbumin Hydrolysate,Racto)
0,375 g TPB (Tryptose Phosphate Broth,dehydrated)
1,26 g F 10 (TC Medium HAM F 10,dried)
1,374 g 199 (TC Medium 199,dried)
4 % Earle's A
· % Earle's B
0,35 g Bikarbonat

Schließlich wird steriles, inaktiviertes Kälberserum bis zu einer Konzentration von 3 %.zugesetzt.

[1]Es wird ausschließlich mit Medium 199, F 10 gearbeitet. Sämtliche Bestandteile des Mediums werden von Difco Laboratories,Detroit,Michigan,USA, bezogen.

Trypsin 0,25 % ig in PBS (= PBST)

Sterile PBS pH 7,3 (nach HOSKINS, 1967)

Organmaterial

Von den zu untersuchenden Organen werden gleiche Mengen von 0,1 g (von der Schilddrüse 0,05 g) abgewogen. Dieses Organmaterial wird mit 1 ml 0,85 % iger NaCl durch Zerstoßen mit einer Pipette und durch Schütteln mit Glasperlen zu einer homogenen Suspension verarbeitet. Durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen wird der Austritt des Virus aus dem Gewebe erzielt. Der Überstand der Suspension wird für die Titration verwendet. Pro ml Organsuspension sind 0,01 g Dihydro-Streptomycinsulfat und 10 000 IE Penicillin zugesetzt.

Zellmaterial

Als Zellen dienen sekundäre Gänseembryofibroblastenkulturen. Die in Roux-Flaschen gewachsenen primären Zellkulturen werden durch Einwirkung von PBST (30 Minuten) angedaut und bei 153 x g schonend zentrifugiert. Danach werden die sekundären Zellen in einer Dichte von 10^4 Zellen pro ml in Wachstumsmedium verwendet.

Die in den Mikroplatten ausgesäten Zellen werden bei 5 % CO_2 Zufuhr und einer Temperatur zwischen 38,5° C bis 39° C und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Durchführung der Methode

Sämtliche Manipulationen werden unter Wahrung der Sterilität durchgeführt. In Glasröhrchen werden unter Pipettenwechsel von jedem Organ Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-8} angelegt. Als Reaktionsmengen dienen Tropfen aus geeichten Pasteurpipetten. Von jeder dieser Verdünnungsstufen werden dann mit einer Pasteurpipette 3 Tropfen, (0,025 ml/Tropfen) in entsprechende Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Mit einer 5 ml Pipette wird pro Verdünnung 1 Tropfen Zellsuspension zugefügt, was einer Zellzahl von 30 000 Zellen entspricht. Als negative Kontrollen werden nichtinfizierte Zellen kultiviert. Als Viruskontrollen werden Zellen mit GHV, 43. Passage, 10^{-3} verdünnt inokuliert. 1 - 2 Tage nach Ansatz der Titration wird pro Verdünnung 1 Tropfen Medium zugefügt. Nach 5 Tagen wird das alte Medium mittels einer Vakuumvorrichtung abgehebert und durch 2 Tropfen neuen Mediums aus einer 5 ml Pipette ersetzt.
Die inokulierten Kulturen werden durch Abdecken vor Austrocknung und Kontamination geschützt und täglich auf das Auftreten zytopathischer Veränderungen untersucht. Das Ende der Titration kann mit 14 Tagen angegeben werden.

Die Beurteilung der Zellrasen erfolgt mit einem umgekehrten Mikroskop, mit Beleuchtungseinrichtung für Durchlicht (Fa. Leitz), bei 100 facher Vergrößerung.

Ergebnisse

a) Erscheinungsformen der Fluoreszenz bei vorliegenden Untersuchungen

Spezifische Fluoreszenz ist durch ihre intensiv gelb bis apfelgrüne Farbe von dem schwach grün gefärbten Gewebe zu differenzieren. Ebenso kontrastiert sie deutlich mit der meist bläulichen Eigenfluoreszenz bestimmter Gewebe. Bei den durchgeführten Untersuchungen ist spezifische Fluoreszenz teilweise staubförmig fein, diffus verteilt zu beobachten. In anderen Präparaten liegen stecknadelkopfgroße, fluoreszierende Partikel oder auch schollenartige Aggregationen vor. Teilweise treten große, meist ovale Fluoreszenzgebilde auf, die in ihrem Inneren wiederum ein fluoreszierendes Netzwerk erkennen lassen. In einem Gesichtsfeld können gleichzeitig verschiedene Fluoreszenzerscheinungen gesehen werden. Diese finden sich deutlich im Kern, aber auch in dem die Kerne umgebenden Plasmamaterial. In Präparaten von Herzmuskel, Gefäßwand, Lunge und Nebenniere, sowie vereinzelt auch in anderen Organen sind intensiv fluoreszierende Erythrozyten mit ungefärbtem Kern gelegentlich zu beobachten. Diese stellen entweder die einzigen Fluoreszenzerscheinungen in einem Präparat dar, oder sie treten zusammen mit anderen auf.

b) Veränderungen in der Gewebekultur

In den Mikrotiterplatten werden erste zytopathologische Veränderungen nach 5 - 6 Tagen beobachtet. Im Zytoplasma tritt Granulation auf. Die Zellen kontrahieren sich und runden sich gleichzeitig ab. Der dichte Zellrasen verschwindet; es kommt zur Lysis der veränderten Zellen, und in fortgeschrittenem Stadium sind nur noch Zelltrümmer sichtbar. Die Kulturen können völlig zerstört werden. Neben diesen Veränderungen kommt es auch zur Ausbildung von länglichen

Riesenzellen, die besonders in Kulturen von Moschusentenfibroblasten beobachtet werden.
In Plastikpetrischalen ist Ablösung von Zellfetzen oder des ganzen Zellverbandes ein seltenes Ereignis.

Erste zytopathische Veränderungen sind in niedrigen Virusverdünnungsstufen ab dem 6. - 7. Tag zu beobachten. In den Kulturen kann in Abhängigkeit von der Viruskonzentration vom 7. bis zum 14. Tag völlige Zerstörung auftreten. In diesen Kulturen ist nach Fluoreszenzfärbung keine Lokalisierung des Virusantigens mehr möglich.

c) Ergebnisse der bei Embryonen durchgeführten Untersuchungen

Sektionsbefunde der experimentell infizierten Gänseembryonen:
Die mit GHV infizierten Embryonen sind stark hyperämisch und weisen subkutane Ödeme auf. Herzdilatation und Blutungen in der Herzspitze werden häufig beobachtet. Der Herzmuskel hat ein gekochtes Aussehen. Bei manchen Embryonen sind petechiale Blutungen im Bereich des Oberschnabels vorhanden. Als Veränderungen der Leber sind Vergrößerung, brüchige Konsistenz und zitronengelbe Färbung zu beobachten.

Tabelle III:
Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen der in Gruppe 1 aufgeführten Gänseembryonen (s.Tab.I)

Auf FA	IF	
untersuchte	Tod p.i.	
Organe	12T	16T
Cornea	++	-
Nasen-epithel	++	-
Gehirn	++	-
Herz	+++	-
Milz	++	-
Leber	++	-
Niere	++	+
Darm	++	-
Muskel	+	-
Haut	++	-
Kloake	-	-

Die nach 10 Tagen Bebrütung via CAM (0,5 ml GHV)inokulierten Gänseeier wurden nach spontanem Absterben der Embryonen auf Vorhandensein von fluoreszierendem Antigen untersucht.

FA = Fluoreszierendes Antigen
IF = Fluoreszenz
T = Tage
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
\- = frei von fluoreszierendem Antigen

Tabelle IV:
Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen der in Gruppe 2 aufgeführten Gänseembryonen (Tab.I)

Auf FA untersuchte Organe	Fluoreszenz Tod post inokulationem 6T	8T	9T	9T	9T	12T	15T
Cornea	+	+	+	-	-	-	-
Nasen-epithel	+	+	+	-	+	-	-
Gehirn	+	+	+	+	+	-	++
Herz	++	+++	+	+++	-	-	-
Milz	-	+++	++	+++	++	+	+
Leber	+	+++	+++	+++	++	++	++
Niere	+	+	+	+	++	-	+
Darm	+	+	+	+	+	+	+
Muskel	+	+	+	+	+	+	+
Haut	+	+	+	+	-	+	-

Die nach 11 Tagen Bebrütung via CAM (0,5 ml GHV) inokulierten Gänseeier wurden nach spontanem Absterben der Embryonen auf das Vorhandensein von fluoreszierendem Antigen untersucht.

FA = Fluoreszierendes Antigen
T = Tage
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
\- = frei von fluoreszierendem Antigen

Tabelle V:

Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen der in Gruppe 3 aufgeführten Gänseembryonen (s.Tab.I)

Auf FA untersuchte Organe	Fluoreszenz Tod p.i.			
	10T	12T	13T	15T
Cornea	-	-	-	+
Nasen-epithel	+	-	-	+
Gehirn	+	+	-	+
Herz	++	++	-	-
Milz	-	+	+	++
Leber	++	++	-	+
Niere	+	+	+	+
Darm	++	++	-	-
Muskel	-	+	-	-
Haut	-	+	-	+
Kloake	-	-	-	-
Nebenniere	+	+	-	-

Die nach 13 Tagen Bebrütung via CAM (1 ml GHV) inokulierten Gänseeier wurden nach spontanem Absterben der Embryonen auf Vorhandensein von fluoreszierendem Antigen untersucht.

FA = Fluoreszierendes Antigen
p.i. = post inokulationem
T = Tage
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
\- = frei von fluoreszierendem Antigen

Tabelle VI:
Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen der Gänseembryonen der Gruppe 4 (s.Tab.I)

Auf FA unters. Organe	Fluoreszenz Tod post inokulationem														
	3T	3T	4T	4T	4T	5T	5T	5T	6T	6T	6T	6T	6T	8T	1
Cornea	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	/	-	
Nasen-epithel	/	-	++	++	+	+	/	++	+	+	+	+	/	-	
Gehirn	+	++	++	+	+	++	/	++	+	+	/	+	/	+	
Herz	/	-	++	++	-	++	/	+++	++	++	++	+	/	++	
Milz	/	-	++	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	
Leber	++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	/	++	+	/	++	
Niere	+	+	+	+	++	++	+	+	++	+	++	+	+	+	
Darm	+	++	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Muskel	+	++	-	-	++	++	++	++	++	+	+	++	+	+	
Haut	-	/	-	-	+	/	/	+++	+	+	+	+	+	+	

Die nach 14 Tagen Bebrütung via CAM (1,0 ml GHV) inokulierten Gänseeier wurden nach spontanem Absterben der Embryonen auf Vorhandensein von fluoreszierendem Antigen untersucht.

FA = Fluoreszierendes Antigen
T = Tage
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
\- = frei von fluoreszierendem Antigen
/ = nicht untersucht.

Tabelle VII:
Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen der in Gruppe 5 aufgeführten Gänseembryonen.(s.Tab.I)

Auf FA untersuchte Organe	IF Tod p.i. 9T	IF Tod p.i. 16T
Cornea	+	-
Nasen-epithel	+	-
Gehirn	+	-
Herz	-	-
Milz	-	+
Leber	++	-
Niere	-	+
Darm	+	-
Muskel	+	+
Haut	-	-
Kloake	-	-
Nebenniere	+	+

Die nach 16 Tagen Bebrütung via CAM (1 ml GHV) inokulierten Gänseeier wurden nach spontanem Absterben der Embryonen auf Vorhandensein von fluoreszierendem Antigen untersucht.

FA = Fluoreszierendes Antigen
IF = Fluoreszenz
p.i. = post inokulationem
T = Tage
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
\- = frei von fluoreszierendem Antigen

d)Untersuchungsergebnisse bei Gänseküken

Erste klinische Anzeichen für das Haften der Infektion sind Verweigerung der Futteraufnahme und vermehrter Wasserverbrauch. Die Gänseküken sind apathisch und schwach. Bei Fluchtversuchen fallen sie durch schwankenden Gang und gelegentliches Niederstürzen auf. Sero-muköser Ausfluß aus Nase und Schnabel kann beobachtet werden. Die Augen sind eingefallen. Im weiteren Krankheitsverlauf tritt stoßweise Atmung bei geöffnetem Schnabel auf. Teilweise kann Pinguinstellung beobachtet werden, wobei eine Fluktuation im Abdomen palpierbar ist.
Ältere Gänseküken zeichnen sich durch erhebliche Wachstumsdepression sowie durch Federverlust im Rücken- und Nackenbereich aus.

Bei bakteriologischen Untersuchungen von Leber und Herz konnten folgende Keime isoliert werden: Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli und Salmonella typhimurium in der Anreicherung. Außerdem wurden des öfteren auch Aspergillen nachgewiesen.

Die im folgenden aufgeführten Tabellen reflektieren:

a) die pathologisch anatomischen Veränderungen der untersuchten Gänseküken

b) die Lokalisierung des Gänsehepatitisvirus in verschiedenen Organen von infizierten GK aufgrund des Immunofluoreszenztestes

c) den Virusgehalt von Organen, der durch Titration in der Gewebekultur ermittelt würde.

Tabelle VIII:

Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen von Organen der Gänseküken aus Gruppe 1, sowie von Titrationen mittels der Mikromethode, und Angaben pathologisch-anatomischer Veränderungen.

Untersuchte Organe	Flügelmarke Nr. 785 5 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 957 6 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 605 7 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 265 20 Tage p.i. getötet		
	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund
Cornea	/	/	-	/	/	-	/	/	-	-	/	-
Nasenepithel	/	/	-	/	/	-	/	/	-	+	/	-
Hypophyse	/	/	-	/	/	-	+++	/	-	+	/	-
Schilddrüse	+	/	-	+	/	-	+	/	-	+	/	Hypertrophie
Nebenschilddrüse	+	/	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-
Nebenniere	+++	/	Hypertrophie	+++	/	Hypertrophie	+++	10^3	-	+++	10^1	-
Pankreas	-	/	Nekrose	+	/	Nekrose	+	/	-	+	10^1	Nekrose
Thymus	++	/	-	+++	10^3	-	+++	10^2	-	+	10^1	Petechien
Leber	++	10^3	Schwellung, Fibrinausschwitzg. auf der Oberfl.	+++	10^4	Schwellung	+	10^2	UV, Fibrinausschwitzung	++	10^1	UV, derb, Fibrinausschwitzung
Niere	+	10^3	-	++	10^4	-	+	10^1	-	-	0	-
Milz	+++	10^4	-	++++	10^5	-	+++	10^4	-	+	10^1	-
Herz	++	10^4	Hypertrophie u. Pericarditis	++	10^4	Hypertrophie u. Pericarditis	++	10^4	exzentrische Hypertrophie	+	10^1	Petechien
Duodenum	-	/	-	-	/	-	+	10^1	-	-	/	-
Muskel	+	10^2	-	+	10^3	-	+	10^1	-	-	/	-
Trachea	++	/	-	+	/	-	+	/	-	-	/	-
Gefäßwand	+	/	-	++	/	-	+	/	-	-	/	-
Lunge	-	/	-	+	/	-	+	/	-	/	/	-
Nierzeldrüse	-	/	-	-	/	-	/	/	-	-	/	-
Bursa Fabricii	+	/	-	-	/	-	+	/	-	+	10^1	vergrößert
Haut	+	10^3	-	+	10^3	-	-	0	-	+	10^1	gummiartig, schwer abziehb.
Aszitesflüssigkeit	+	/	ca. 30 ml Bauchhöhlenflüssigk.	/	/	-	/	/	-	++	/	40 ml Flüssigk.
Peritoneum	-	/	Peritonitis	/	/	-	/	/	-	/	/	-

Nach Infizierung der 7 Tage alten Gänseküken mit 1 ml GBV,i.m., wurden diese in Abständen von 24 Stunden p.i. (d.h. Küken 785 am 20. Tag p.i.) getötet.

IF = Fluoreszenz
KID_{50} = 50 % kulturinfektiöse
UV = Umfangsvermehrung

\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
\- = ohne Befund
/ = nicht untersucht

Tabelle IX:

Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen der Gänseküken aus Gruppe 2, sowie von Titrationen mittels der Mikromethode und Angaben makroskopischer Veränderungen.
Nach Infizierung der 3 Tage alten Gänseküken mit 1 ml GHV- SHM 319 oral, wurden diese in Abständen von 24 Stunden getötet und untersucht.

Untersuchte Organe	Flügelmarke Nr. 104 2 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 746 3 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr.756 4 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 531 5 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 438 6 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 561 7 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 587 8 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 921 9 Tage p.i. getötet		
	IF	ID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund
Cornea	-	/	-	-	/	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Nasenepithel	++	/	-	++	/	-	+++	/	-	+	/	-	+	/	-	+	/	-	-	/	-	-	/	-
Pharynx	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	-	+	/	-	+	/	-	+	/	-	-	/	-
Hypophyse	-	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	-	+	/	-	-	/	-	/	/	-	-	/	-
Schilddrüse	+	/	-	+	/	-	+	/	-	-	/	Hypertrophie	++	10^4	Hypertrophie	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Neben-schilddrüse	+	/	-	/	/	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Nebenniere	++	10^3	-	++++	10^4	-	+++	10^4	-	+++	10^3	-	+++	10^4	Hypertrophie	++	10^2	-	+++	10^3	Hypertrophie	-	/	-
Pankreas	+	/	-	-	/	-	-	/	-	+	/	-	+	10^2	-	-	/	-	+	/	-	-	/	-
Thymus	+	10^3	-	+++	10^2	Petechien	+++	10^2	-	++	10^3	Petechien	+++	10^3	Petechien	+	10^1	-	++	10^3	-	-	/	-
Leber	++	10^4	Schwellung	++	10^2	UV, Marmorierung	++	10^3	Schwellung	++	10^4	hochgradige UV	++	10^3	UV	+	10^1	UV	++	10^3	UV, Fibrin auf der Oberfläche	-	/	-
Niere	-	/	-	+	10^3	-	+	10^3	-	-	0	-	+	/	-	/	/	-	+	10^3	-	-	/	-
Milz	++	10^4	hochgradige Schwellung	+++	10^3	Schwellung	++	10^4	Schwellung	+++	10^4	vergrößert	+++	10^3	Schwellung	+	10^2	-	+++	10^4	-	-	/	-
Herz	+	10^3	-	++	10^4	-	+	10^3	-	/	10^4	Hydropericard	++	10^3	-	++	10^3	-	++	10^3	-	-	/	-
Duodenum	+++	/	-	+++	10^2	-	++	10^2	-	+	10^1	-	+	/	-	+	/	-	-	/	-	-	/	-
Muskel	+	10^1	-	+	10^2	-	-	10^2	-	++	10^3	-	+	10^2	-	++	10^1	-	+	10^1	-	-	/	-
Trachea	-	/	-	++	/	-	/	/	-	-	/	-	+	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Gefäßwand	-	/	-	+	/	-	/	/	-	-	/	-	+	/	-	+	/	-	-	/	-	-	/	-
Lunge	/	/	-	/	/	Pilzknoten (Aspergillus)	-	/	Pilzknoten (Aspergillus)	-	/	-	-	/	-	/	/	Pilzknoten (Aspergillus)	+	/	-	-	/	-
Bürzeldrüse	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Bursa Fabricii	/	/	-	-	/	-	-	/	-	+	/	vergrößert	-	/	-	-	/	-	+	/	-	-	/	-
Haut	-	/	-	-	/	-	/	/	-	-	/	gummiartig, derb, schwer abziehbar	-	/	-	/	/	-	+	/	-	-	/	-
Gallen-blasenwand	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	-	-	/	Gallestauung	-	/	Gallestauung	-	/	Gallestauung	/	/	-
Rektum	+++	/	-	++	/	-	-	/	-	+	10^1	-	+	/	-	-	/	-	+	/	-	-	/	-

IF = Fluoreszenz
UV = Umfangsvermehrung
KID_{50} = 50 % kulturinfektiöse Dosis

\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche "
+++ = starke Fluoreszenz
++++= brillante "
/ = ohne Befund
/ = nicht untersucht.

Für das Gänseküken 531 wurde ein Antikörpertiter von 1:32, für GK 921 ein Titer von 1 : 2048 ermittelt.

Tabelle 4.1

[illegible] Veränderungen der Gonaden aus Gruppe 1 sowie von Hoden mittels der Fluoreszenzmethode und Angaben pathologisch-anatomischer Veränderungen. Nach Infizierung der 10 Tage alten Gänseküken mit 1 ml [illegible] 319 (orall), wurden diese in Abständen von 24 Stunden getötet und untersucht.

	Flügelmarke Nr. [illegible] 4 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 258 5 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 816 6 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr.4/597 7 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr 4/[illegible] 8 Tage p.i. getötet		
	IF	KID_{50} pro $0,1 ml$	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro $0,1 ml$	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro $0,1 ml$	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro $0,1 ml$	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro $0,1 ml$	Path.-anat. Befund
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	Hypertrophie	-	-	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	verwachsen
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	10^2	Petechien	-	10^2	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	10^3	-	-	10^3	Schwellung	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	10^1	-	-	10^1	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	10^3	-	-	10^3	Schwellung	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	10^3	exzentrische Hypertrophie	-	10^3	Hypertrophie	-	-	[illegible]
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	10^2	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	/	nicht vorhand.	-	/	[illegible]	-	-	[illegible]

[illegible] dem TK 4/597 wie ein Antikörpertiter von 1:8 ermittelt.

++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
- = ohne Befund
/ = nicht untersucht

Tabelle XI:

Ergebnisse fluoreszenzserologischer Untersuchungen der Gänseküken aus Gruppe 3B sowie von Titrationen mittels der Mikromethode und Angaben pathologisch - anatomischer Ver - änderungen. Nach Infizierung der 10 Tage alten Gänseküken mit 1 ml GHV-Isolat F 4172 (oral), wurden diese in Abständen von 24 Stunden getötet und untersucht.

Untersuchte Organe	Flügelmarke Nr.4/565 1 Tag p.i. getötet			Flügelmarke Nr.4/839 2 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr.4/838 3 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr.4/907 4 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr.4/674 5 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 508 6 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr. 268 7 Tage p.i. getötet			Flügelmarke Nr.4/627 8 Tage p.i. getötet		
	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund
Cornea	/	/	-	/	/	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	Trys	/	-
Nasenepithel	/	/	-	-	/	-	+	/	-	/	/	-	+	/	-	-	/	-	+	/	-	++	/	-
Pharynx	/	/	-	-	/	-	+	/	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	Trys	/	-
Hypophyse	-	/	-	-	/	-	++	/	-	-	/	-	++	/	-	++	/	-	/	/	-	+	/	-
Schilddrüse	-	/	-	-	/	-	+++	10^3	-	+	10^1	-	+	10^1	-	++	10^2	-	+	10^1	-	++	10^3	-
Neben-schilddrüse	-	/	-	-	/	-	++	/	-	++	/	-	+	/	-	++	/	-	++	/	-	-	/	-
Nebenniere	-	/	-	-	/	-	++	10^4	-	++	10^3	-	++	10^3	-	Trys ++++	10^4	vergrößert	++++	10^4	vergrößert	++++	10^4	-
Pankreas	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Thymus	-	/	-	-	/	-	++++	10^3	-	+++	10^3	-	+++	10^4	Petechien	++	10^3	Petechien	++	10^2	-	++	10^3	Petechien
Leber	+	/	-	-	/	-	+++	10^3	-	++++	10^4	-	+++	10^3	hochgrad. UV	+++	10^4	derbe Konsist., organ.Fibrin auf der Oberfläche	++	10^3	derbe Konsist.	++	10^3	UV
Niere	-	/	-	-	/	-	+	10^2	-	+	10^1	-	+	10^2	-	+++	10^4		+	10^1	-	+	10^3	-
Milz	+	/	-	-	/	-	++++	10^4	-	+++	10^2	-	++++	10^5	Schwellung	+++	10^3	Schwellung	++	10^3	-	++++	10^4	-
Herz	+	/	-	-	/	-	+	10^3	-	++	10^2	-	++	10^3	Hypertrophie	+	10^2	exzentrische Hypertrophie	Trys ++	10^1	exzentrische Hypertrophie	Trys ++	10^3	exzentrische Hypertrophie
Duodenum	-	/	-	-	/	-	+	/	-	+	/	-	-	/	-	++	10^3	-	+	/	-	+	10^3	-
Rektum	+	/	-	-	/	-	+	10^1	-	+	10^1	-	+	10^1	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Muskel	-	/	-	-	/	-	-	/	-	+	/	-	+	10^1	-	+	10^3	-	+	10^1	-	+	10^2	-
Trachea	-	/	-	-	/	-	+	/	-	/	/	-	-	/	-	+	/	-	Trys +	/	-	Trys	/	-
Gefäßwand	+	/	-	-	/	-	-	/	-	+	/	-	+	/	-	++	/	-	-	/	-	++	/	-
Lunge	-	/	-	-	/	-	-	/	-	/	/	-	/	/	-	+++	10^3	-	++	/	-	++	/	-
Bursa Fabricii	/	/	-	-	/	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Haut	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	schwer abziehbar (Subkutis sulzig)	-	/	-	-	/	-
Oesophaguswand	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-
Ascites-flüssigkeit	/	/	nicht vorhand.	/	/	nicht vorh.	/	/	nicht vorhand.	/	/	nicht vorhand.	/	/	nicht vorhand.	+	/	20 ml Bauch-höhlenflüssigkeit	/	/	nicht vorhand.	/	/	nicht vorhand.

p.i. = post infectionem IF = Fluoreszenz

KID_{50} = 50 % kulturinfektiöse Dosis

\+ = schwache Fluoreszenz ++++ = brillante Fluoreszenz

++ = deutliche Fluoreszenz - = ohne Befund

+++ = starke Fluoreszenz / = nicht untersucht.

Tabelle XII:

Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen der Gänseküken der Gruppe 4, mit Angaben pathologisch-anatomischer Veränderungen. Nach Infizierung der 14 Tage alten Gänseküken mit 1 ml GHV-SHM 319 i.m. wurden diese nach spontanem Verenden untersucht.

Untersuchte	Flügelmarke Nr.32823 9 Tage p.i. verendet		Flügelmarke Nr.32232 10 Tage p.i. verendet		Flügelmarke Nr. 32109 14 Tage p.i. verendet		Flügelmarke Nr.32791 14 Tage p.i.verendet		Flügelmarke Nr.32137 14 Tage p.i. verendet	
Organe	IF	Path.-anat. Befund	IF	Path.-anat. Befund	IF	Path.-anat. Befund	IF	Path.-anat. Befund	IF	Path.-anat. Befund
Cornea	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-
Nasenepithel	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-
Hypophyse	/	-	/	-	-	-	/	-	-	-
Schilddrüse	++	-	+	Hypertrophie	+	Hypertrophie	++	Hypertrophie	+	-
Nebenschilddrüse	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nebenniere	/	-	++	vergrößert	-	vergrößert	+	vergrößert	++	-
Pankreas	-	-	-	Nekrose	-	Nekrose	-	-	-	-
Thymus	++	-	++	-	-	-	+	-	-	-
Leber	++	Schwellung	+	derbe Konsistenz	-	derbe Konsistenz	-	derbe Konsistenz	-	derbe Konsistenz organ.Fibrin auf der Oberfläche
Niere	/	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Milz	++	Schwellung	++	-	++	-	++	-	+	-
Herz	+	Hypertrophie	+	exzentrische Hypertrophie	-	exzentrische Hypertrophie	-	exzentrische Hypertrophie	-	Perikarditis
Duodenum	++	-	+	-	++	-	-	-	-	-
Muskel	/	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Trachea	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gefäßwand	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lunge	/	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Bürzeldrüse	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bursa Fabricii	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haut	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aszitesflüssigkeit	/	-	/	-	++	200 ml Bauchhöhlenflüssigkeit	/	-	/	-

IF = Fluoreszenz
/ = nicht untersucht
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
\- = ohne Befund

Tabelle XIII:

Ergebnisse fluoreszenzserologischer Untersuchungen eines Gänsekükens, welches im Alter von 3 Tagen über das Trinkwasser mit GHV Isolat F 4173 infiziert worden war. Außerdem ist der Virusgehalt in Organen dargestellt. Die Tötung und Untersuchung des Tieres erfolgte 9 Tage p.i.

Untersuchte Organe	Flügelmarke Nr.489 9 Tage p.i. getötet		
	IF	KID_{50} pro 0,1ml	Path.-anat. Befund
Hypophyse	+	/	-
Schilddrüse	+	10^3	-
Nebenschilddrüse	+	/	-
Nebenniere	++++	10^4	-
Pankreas	+	/	-
Thymus	+++	10^4	Petechien
Leber	+++	10^4	hochgradige Schwellung
Niere	++	10^4	-
Milz	++++	10^5	-
Herz	+	10^3	-
Duodenum	+	/	-
Rektum	+	/	-
Muskel	++	10^3	-
Trachea	+	/	-
Gefäßwand	+	/	-
Lunge	-	/	-
Bursa-Fabricii	-	/	-
Haut	+	/	-

IF = Fluoreszenz
p.i. = post infectionem
KID_{50}/0,1ml = 50 % kultur-infektiöse Dosis
- = ohne Befund

\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
++++ = brillante Fluoreszenz
/ = nicht untersucht

Tabelle XIV:

Ergebnisse fluoreszenzserologischer Untersuchungen bei einem Moschusentchen, mit Angaben pathologischer Veränderungen.

Untersuchte	Flügelmarke 4/816 31 Tage p.i. getötet	
Organe	IF	Path.-anat. Befund
Cornea	/	-
Nasenepith.	-	-
Pharynx	/	-
Hypophyse	++	-
Schilddrüse	++	-
Nebenschilddrüse	+	-
Nebenniere	+++	-
Pankreas	+	-
Thymus	++	Petechien
Leber	-	Schwellung
Niere	+	-
Milz	+	-
Herz	++	Hydropericard
Duodenum	-	-
Rektum	/	-
Muskel	-	-
Trachea	+	-
Gefäßwand	-	-
Bürzeldrüse	-	-
Bursa Fabricii	-	-
Haut	+	Federausfall

IF = Fluoreszenz
p.i. = post infectionem
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
\- = ohne Befund
/ = nicht untersucht

Das Tier wurde im Alter von 5 Tagen oral mit 1,0 ml GHVhaltiger Allantoisflüssigkeit (mittels Pipette) infiziert. Als es klinisch hochgradige Wachstumsdepression und Federausfall zeigte wurde es getötet und untersucht.

Tabelle XV:

Ergebnisse von Routineuntersuchungen auf fluoreszierendes GHV- Antigen bei natürlich infizierten Gänseküken. Es handelt sich um Gössel, die mit der klinischen Verdachtsdiagnose Gänsehepatitis tot oder im Verenden aus Geflügelbeständen eingesandt wurden.

Untersuchte Organe	Fluoreszenz						
	GK1	GK2	GK3	GK4	GK5	GK6	GK7
Cornea	/	-	-	-	-	/	/
Nasenepith.	+	-	+	+	/	/	/
Gehirn	-	-	-	-	/	/	/
Schilddrüse	/	/	/	/	/	+	/
Nebenschilddrüse	/	/	/	/	/	+	/
Nebenniere	/	/	/	/	/	++	/
Pankreas	/	-	/	+	/	+	/
Leber	+	+	+	+	+	+	++
Niere	/	-	+	/	/	-	/
Milz	+	+	+	+	+++	+	+++
Herz	+	+	+	/	/	-	/
Duodenum	+	+	+	+	-	-	"
Muskel	+	-	-	/	/	/	+
Lunge	/	/	/	/	/	+	-
Haut	-	/	/	-	/	/	/

GK 1.. = Gänseküken
\+ = schwache Fluoreszenz
++ = deutliche Fluoreszenz
+++ = starke Fluoreszenz
\- = frei von fluoreszierendem Antigen
/ = nicht untersucht.

(Die Wahl der einzelnen Organe ist abhängig vom Frischzustand der Tiere.)

VI. DISKUSSION:

Von den bekannten Immunofluoreszenzmethoden hat sich zum Nachweis des GHV-Antigens der direkte Test bewährt. Da dieser nur durch 2 Komponenten charakterisiert ist, wird die Fehlerquelle verringert und es können so aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der schnellen Durchführbarkeit.
Es ist anzunehmen, daß die verschiedenartigen Fluoreszenzgebilde durch Kern- und Zelldegeneration beeinflußt sind. Intensiv auftretende Fluoreszenz kann als sehr dichte Packung des Antigenmaterials interpretiert werden. Ob es sich hierbei um unterschiedliche Antigenkomponente handelt, wurde nicht untersucht. Die beschriebenen großen, ovalen Fluoreszenzerscheinungen dürften mit den von SCHETTLER histologisch dargestellten Kerneinschlüssen identisch sein.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß 10 - 14 Tage alte Gänseembryonen dem Gänsehepatitisvirus ausgezeichnete Wachstumsbedingungen bieten. Das Virus tötet diese Embryonen vor dem Schlupf. Die Zeitspanne zwischen Inokulation und Tod der Embryonen schwankt erheblich. FITC Präparate von CAM und AAF der spezifisch abgestorbenen Embryonen liefern brillante Bilder mit hoher Intensität und großer Menge an fluoreszierenden Partikeln. Bei Titrationen von CAM-Material in der Gewebekultur werden Titer von 10^5 $KID_{50}/0{,}1$ ml (= 50 % kulturinfektiöse Dosis) erhalten. Nach dem Absterben der Embryonen zwischen dem 3. und 9. Tag p.i. ist nahezu in allen untersuchten Organen Virusantigen nachzuweisen, besonders konzentriert in Herz und Leber. Auch in der Haut ist reichlich spezifische Fluoreszenz vorhanden.

Bei später abgestorbenen Embryonen (nach dem 9. Tag p.i.) kommt es wahrscheinlich zu einer Verzögerung der primären Virusvermehrung, deren Ursache nicht geklärt werden konnte. In diesen Fällen gelingt der Nachweis von fluoreszierendem Antigen nahezu ausschließlich in Leber, Herzmuskel und Niere. Das deutet darauf hin, daß bei älteren Embryonen die Virusvermehrung vorwiegend in diesen Organen stattfindet.
Die von verschiedenen Autoren wie V.PÜLOW und PAYNE (1969) vertretene Ansicht, daß Embryonen vielfach unspezifisch in der Fluoreszenz reagieren, konnte nicht bestätigt werden. Während in infizierten Eikulturen das GHV-Antigen mittels der Fluoreszenz in den Embryonen sicher nachweisbar ist, reagieren nichtinfizierte Gänseembryonen stets negativ. Die Methode kann daher als wichtiges differenzialdiagnostisches Hilfsmittel bei Feldisolaten verwendet werden. Zur Identifizierung des GHV empfiehlt es sich CAM und Leber der infizierten Embryonen zu untersuchen, da diese einfach zu präparieren sind und bei Infektionen mit Sicherheit eines dieser Organe positiv reagiert. Der Antigennachweis aus dem Zellsediment der Allantoisflüssigkeit ist das einfachste Verfahren.

Beim Nachweis fluoreszierenden Antigens in Gänseküken können, unter Berücksichtigung des Krankheitsverlaufes, hinsichtlich des Auftretens von fluoreszierendem Antigen in Organen folgende Stadien beobachtet werden.

1) In den ersten 2 Tagen p.i. ist Virusantigen nur in wenigen Organen (Milz, Leber) unter schwachen Fluoreszenzerscheinungen sichtbar. Die Gänseküken sind makroskopisch unverändert.

2) Am 3. und 4. Tag p.i. ist auch bei pathologisch-anatomisch noch unveränderten Tieren bereits deutliche spezifische Fluoreszenz in Milz, Herz und Leber zu beobachten.

3) In der Zeit vom 5. - 9. Tag p.i. tritt fluoreszierendes Antigen in nahezu allen untersuchten Organen auf. Die Organpräparate dieser Tiere zeigen die stärksten Fluoreszenzerscheinungen. Zu diesem Zeitpunkt treten auch deutliche makroskopische Veränderungen an Leber, Herz, Milz und Thymus auf.

4) Bei nach dem 9. Tag p.i. untersuchten, meist verendeten Tieren ist fluoreszierendes Antigen in den hauptsächlich affinen Organen weniger stark vorhanden, obwohl diese morphologisch noch sichtbar verändert sind. Dagegen ist das Virusantigen zu diesem Zeitpunkt häufig in der Nebenniere und Schilddrüse anzutreffen. Diese Organe weisen ebenfalls makroskopische Veränderungen in Form von Hypertrophie auf.

Bei Titrationen der fluoreszenzpositiven Organproben in Gewebekulturen zeigten die bei subjektiver Beurteilung intensiv fluoreszierenden Organe im allgemeinen höhere Virustiter als soche mit schwachen Fluoreszenzerscheinungen. Es können also aufgrund der Fluoreszenzuntersuchungen von Organen Rückschlüsse auf deren Virusgehalt gezogen werden.

Intramuskulär infizierte Gänseküken unterscheiden sich hinsichtlich des Krankheitsbildes und der Viruslokalisierung nicht von oral infizierten Gösseln. Nur bei einem Gänseküken mit hohem Antikörpertiter werden keine Krankheitserscheinungen beobachtet. Bei ihm ist kein fluoreszierendes Antigen nachzuweisen.
Die direkte Fluoreszenztechnik hat sich bei Infektionen mit GHV zum qualitativen Virusnachweis bewährt. Die damit ermöglichte Lokalisierung von Virusantigen in affinen Organen kann für die Diagnosestellung herangezogen werden.

Stark virushaltige Organe sind Milz, Leber, Herz, Nebenniere und Schilddrüse. Es ist anzunehmen, daß die in diesen Organen beobachteten Alterationen durch direkte Viruswirkung ausgelöst wurden. Bei Tieren mit Aszites war in Sedimenten der Bauchhöhlenflüssigkeit ebenfalls deutliche Fluoreszenz zu beobachten.

Es hat sich gezeigt, daß Fluoreszenzfärbung von Corneaabklatschpräparaten nicht zur Diagnosestellung herangezogen werden kann, da in solchen nur selten Virusantigen dargestellt werden konnte.

Im Gegensatz zu den makroskopisch feststellbaren Veränderungen des Pankreas konnte bei den hier durchgeführten Untersuchungen in diesem Organ nicht regelmäßig fluoreszierendes GHV-Antigen nachgewiesen werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß diese Veränderungen virusspezifisch sind, da sie bei Kontrolltieren nicht zu beobachten waren. Der nur selten geglückte Antigennachweis könnte damit erklärt werden, daß in den hier durchgeführten Untersuchungsintervallen ein Stadium der Anreicherung GHV-spezifischen Antigens im Pankreas nicht erfaßt wurde. Andererseits hat SCHETTLER spezifische Fluoreszenz auch im Pankreas beobachtet.

Da in vorliegenden Untersuchungen der Virusnachweis in der Haut der Küken nur selten und in der Bürzeldrüse nie gelang, dürften die dort beschriebenen Veränderungen nicht die direkte Folge einer Viruseinwirkung darstellen. Es müßte denn sein, daß es in diesen Organen zu einer sehr kurzfristigen Virusbesiedlung kommt, die bei dem 24-stündigen Untersuchungszyklus ebenfalls nicht erfaßt wird. Häufig kann fluoreszierendes Antigen in endokrinen Organen nachgewiesen werden, welches besonders konzentriert in der Nebenniere und weniger konzentriert in der Schilddrüse auftritt. Inwieweit mit dieser Viruslokalisation klinische Symptome, wie Federausfall, Wachstumsdepression und Appetitlosigkeit in Zusammenhang stehen, ist noch zu klären.

Es ist anzunehmen, daß diese Erscheinugen als Folge primär geschädigter Organe auftreten. Der Nachweis spezifischer Fluoreszenz in Nasenepithel und Darmwand kennzeichnen den Ausscheidungsweg des Virus.

Bei Untersuchungen natürlich infizierter Gössel und bei Testung eines experimentell infizierten Moschusentchens konnten die gleichen Manifestationsorgane für das Virus festgestellt werden, wie bei experimentell infizierten Gösseln. Die Fluoreszenz war bei Feldinfektionen allerdings weniger ausgeprägt, was für einen geringeren Virustiter sprechen könnte. Wahrscheinlich ist jedoch, daß die Tiere im Feld, genau wie die experimentell infizierten Tiere erst nach dem Höhepunkt der Virusvermehrung an den Folgen der Organveränderungen sterben.

Die Befunde bei den Gänseembryonen und den Gänseküken können nicht miteinander verglichen werden, da im Embryo vorwiegend im Stadium der Differenzierung und Teilung befindliche unreife Zellen vorliegen, die ausgesprochen günstige Voraussetzungen für die Virusvermehrung darstellen. Die bei Infektionsversuchen an Gänseküken erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei Küken besonders affine Organe (Milz, Leber, Herz) existieren, die bevorzugt eine Virusvermehrung unterstützen, während andere Organe ihrem Antigengehalt nach nur in geringerem Maße am Vermehrungsprozess des Virus beteiligt sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG:

In vorliegender Arbeit wurden 30 Gänseembryonen und 40 Gänseküken experimentell mit Gänsehepatitisvirus infiziert. Das virusspezifische Antigen wurde mittels Immunofluoreszenz in verschiedenen Zeiten p.i. nachgewiesen. Durch Titration von Organproben in Gewebekulturen zum Nachweis infektiösen Virus wurden die bei immunofluoreszenzserologischen Untersuchungen erhaltenen Ergebnissen überprüft. Zusätzlich wurden an Gänsehepatitis erkrankte und verendete Gössel aus Feldinfektionen getestet.

Bei den Embryonen konnte GHV-spezifisches Antigen vorwiegend in der Leber nachgewiesen werden, während die anderen Organe Virusantigen mit wechselnder Häufigkeit aufwiesen. Bei experimentell infizierten Gänseküken konnte unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion innerhalb der empfänglichen Phase GHV-Antigen regelmäßig in Milz und Leber nachgewiesen werden. Auf dem Höhepunkt der Erkrankung sind Milz, Leber, Herz, Nebenniere und Schilddrüse Hauptmanifestationsorgane für das Antigen. Gänseküken aus Feldinfektionen zeigten gleiche Befunde. Abklatschpräparate dieser Organe können für eine fluoreszenzserologische Diagnosestellung bei akut an Gänsehepatitis erkrankten Gösseln verwendet werden. Die sichersten Ergebnisse wurden bei Verwendung frischen Organmaterials und sofortiger Auswertung erhalten.

SUMMARY:

In this work 30 goose embryos and 40 goslings were infected experimentally with the Goose Hepatitis Virus (GHV). The virus specific antigen has been demonstrated by immunofluorescent methods at various times p.i. The results received by immunofluorescence were checked by isolation and titration of organ material of the same origin in tissue cultures. In addition goslings diseased or deceased as a result of field infections with GHV were tested. In embryos GHV-specific antigen was demonstrated mainly in the liver, whereas other organs showed virus antigen in various frequency. In experimentally infected goslings fluorescent GHV-Antigen could be shown regularly in in spleen and liver at any time within the sensitive life period. At the peak of the disease spleen, liver, heart, adrenals and thyroid are the main manifestation organs for the antigen. Goslings from field cases showed the same results. Slide preparations of the organs mentioned from goslings in the acute state of the disease can be taken for diagnosis using the direct fluorescent test. The best results were obtained from fresh material without storage and preparations being examined within few hours.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

von BÜLOW V. und L. N. PAYNE
Direkter Immunofluoreszenztest bei der Marek' schen Krankheit
Zbl. Vet. Med., B 17, 460 - 478 (1970)

van CLEEF S.S.M. and J.Th. MILTENBURG
En erustige acuut verlopende virusziekte bij ganzekuikens gepaard gaande met grote sterfte.
Tijdschr. Dieregeneesk., 91, 372 (1966)

COONS A. H.
Fluorescent Antibody Methods
General Cytochem. Methods 1, 339 -422 (1958)

CSATARI M. K. and I. NYREDY
The agent of goose influenza
Vet. Bull. 36, 4636 (1966)

CSONTOS L. and Marta MIKLOVICH- KIS CSATARI
Etiological studies on Gosling Influenza.
II. Experimental infection with the isolated virus.
Acta Vet. Academiae Scientiarum Hungaricae
17, 155 - 120 (1967)

COUDERT M., FEDIDA M., DANNACHER G., PEILLON Myriam, LABATUT R. et P. FERLIN
La maladie dite: "maladie à virus de l'oison"
Recueil de médecine vétérinaire. CXL VIII (1972)

CRIGHTON G. W. and G.T. WILKINSON
A disease of goslings new to Britain.
Vet. Rec. 87, 58 (1970)

GAUDRY D., PRECAUSTA P., DE SAINT- AUBERT G., FONTAINE J., JANSEN J., WEMMENHOVE R. et KUNST H.
Mise en évidence d' agent infectieux dans un élevage de Canard de Barbarie
Revue de Médecine vétérinaire T. CXXI, No. 4 (1970)

JENTZSCH K.D.
Immunofluoreszenz in der medizinischen Mikrobiologie
Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig (1967)

KAWAMURA A.
Fluorescent antibody techniques and their application
University of Tokyo Press; University Pork Press,
Baltimore, Maryland and Manchester, England (1969)

KONSTANTINOW - SIEBELIST Ingeborg in
STARKE Günter
Virologische Praxis, 2. Auflage, S. 227 - 245 (1968)
G. Fischer Verlag, Jena

KONTRIMAVICHUS L. M., KLEIKHMENEVA L. N., KARPOV G. M.,
KOZNOVA E. J., KUDRAYAVTSEV F.S.
Infectious enteritis in goslings.
Veterinariya Moscow 43, No. 12 , 34 - 36
Ref. vet. Bull. 37, 3346 (1967)

KONTRIMAVICHUS L. M. and MAIBORODA A. D.
Propagation of goose enteritis virus in tissue culture
Byull vses Inst. eksp. Vet., No 4, 11 - 12 (1968)

KRAUSS H.
Eine verlustreiche Aufzuchtkrankheit bei Gänseküken
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift
78, 372 - 375 (1965)

KRAUSS H.
Aviäre REO - Viren
Berliner und Münchner Tierärztl.Wochenschrift (BMTW)
23, 458 - 461 (1967)

MANDELLI G., RINALDI A., CESSI D., CERVIO G., LODETTI E.
& VALERI A.
Apetti ultrastrutturali della cosiddetta "Influenza
dell 'oca".
Estratto da "Atti della Società Italiana delle Scienze
Veterinarie ", Vol. XXIV (1970)

MANDELLI G., VALERI Andrea, LODETTI E.
Reperti Istologici ed ultramicroscopici di una malattia virale delle giovani oche
Folia vet. lat. 1, 121 (1971)

MC. FADYEAN J. (1902) zit. nach
GRATZL E. und H. KÖHLER
Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten
531 - 535 (1968)
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

NAIRN R. C.
Fluorescent protein tracing 2nd. ed.
Livingstone Ltd., Edinburgh (1964)

POETSCHKE G.
Der Nachweis von Viren und Virusantigenen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper
Prog. med. Virol., 3, 79 - 157 (1961)

POETSCHKE G.
Mündliche Mitteilung (1972)

PURCHASE H. C.
Virus- specific Immunofluorescent and Präzipitin Antigens and Cell- free Virus in the Tissues of Birds infected with Marek' s Disease
Cancer Research 30, 1898 - 1908 (1970)

SCHETTLER H. C.
a) Gänsezucht wird wieder attraktiver
Deutsche Geflügelwirtschaft 3, 23, 55 - 57 (1971)

b) Virushepatitis bei Gänsen
I. Untersuchung zur Klärung der Ätiologie.
Tierärztl. Umschau, 26, 60 - 66 (1971)

c) Isolation of a highly pathogenic Virus from Geese with Hepatitis
Avian Diseases 15, 323 - 325 (1971)

d) Goose Virus Hepatitis in the Canada Goose and Snow Goose.
J. of Wildlife Disease, 7, 147 - 148 (1971)

e) Virushepatitis of Geese
II. Host range of Goose Hepatitis Virus.
Avian Diseases, 15, 809 - 823 (1971)

SCHETTLER H. C.
Nachweis der vertikalen Übertragung des Virus der Gänsehepatitis
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 79,202 - 203 (1972)

TEMESI Z.
Experiments on the aetiology of goose influenza (exsudative septicaemia).
Magyar Allatovosak lapja 21, 385 -388 (1967)

THIEL J. F. and SMITH K. O.
Fluorescent Focus Assay of Virus on Cell Monolayers in Plastic Petri - Plates.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 125, 892 (1967)

WAGNER M.
Fluoreszierende Antikörper und ihre Anwendung in der Mikrobiologie (1967)
Gustav Fischer Verlag, Jena

VIII. Abbildungen

Abb 1: Fluoreszierendes GHV- Antigen in der Nebenniere eines experimentell infizierten Gänseküken (aus Gruppe 2, Nr. 438; Abklatschpräparat). 9 x 13

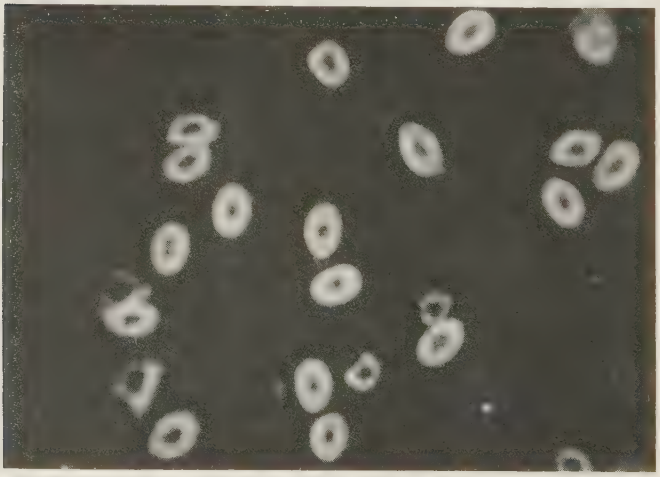

Abb 2: Fluoreszierende Erythrozyten in der Nebenniere eines experimentell infizierten Gänseküken (aus Gruppe 3R, Nr. 508; Abklatschpräparat). 9 x 13

Abb.3: Fluoreszenzgefärbtes Präparat einer mit Nierensuspension (Verdünnung 10^{-4}) inokulierten Gänseembryofibroblastenkultur.
(Es lag ein CPE von +++ vor)

Ø x 1'

Für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung meiner Arbeit möchte ich Frau Prof. Dr. Irmgard Gylstorff sehr herzlich danken.

Herrn Dr. H. C. Schettler danke ich besonders für seine wichtigen Hinweise und seinen jederzeit gewährten Rat.

Frau Dr. Helga Gerlach danke ich für die Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen und die mir erwiesene Unterstützung.

Fräulein G. Haussmann und Fräulein D. Rose möchte ich für ihre technische Assistenz und ihre Hilfe im Fotolabor meinen Dank sagen.

Für die Gewährung eines Promotionsstipendiums bin ich der Zentralen Kommission für die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 23. April 1947 wurde ich, Gabriele Winteroll, als Tochter des Bank- und Versicherungskaufmannes Otto Winteroll und dessen Ehefrau Elisabeth Winteroll, geb. Hurst, in Pfullendorf geboren.
Nach Besuch der Grundschule in Friedrichshafen legte ich dort am Graf-Zeppelin-Gymnasium im Oktober 1966 die Reifeprüfung ab.
Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Universität in Giessen das Studium der Veterinärmedizin. Nach bestandener tierärztlicher Vorprüfung im Sommer 1968 wechselte ich an die Ludwig-Maximilians-Universität in München über, wo ich im Oktober 1971 das tierärztliche Staatsexamen absolvierte.
Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1971 bis 1973.